

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05095792 A**

(43) Date of publication of application: **20.04.93**

(51) Int. Cl

**C12P 7/64  
C11C 1/04  
C11C 3/02**

(21) Application number: **03283560**

(22) Date of filing: **03.10.91**

(71) Applicant: **AGENCY OF IND  
SCIENCE & TECHNOL BOOSOO  
YUSHI KK**

(72) Inventor: **KOSUGI YOSHIJI  
TOMIZUKA NOBORU  
AZUMA NAOTERU**

(54) **PRODUCTION OF OIL AND FAT CONTAINING  
CONCENTRATED HIGHLY UNSATURATED  
FATTY ACID**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject oil and fat containing highly unsaturated fatty acid at a high concentration and useful as a preventive for circulatory diseases, functional food, etc., from an inexpensive raw material in high efficiency by a specific method using an oil and fat containing highly unsaturated fatty acid as a raw material.

CONSTITUTION: An oil and fat containing highly unsaturated fatty acid (preferably an oil and fat rich in  $\Omega$ -3 highly unsaturated fatty acid triglyceride such

as fish oil) or an alcohol ester of a highly unsaturated fatty acid is hydrolyzed with an immobilized lipase (preferably produced by immobilizing a lipase of a microorganism of genus *Pseudomonas* to an anion exchange resin). The highly unsaturated fatty acid in the hydrolyzed product is concentrated e.g. by a low-temperature fractional crystallization. The concentrated highly unsaturated fatty acid is converted to triglyceride by reacting with glycerol in the presence of an immobilized lipase (preferably produced by immobilizing a lipase of microorganism of genus *Candida* to an acrylic resin) to obtain the objective oil and fat.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-95792

(43)公開日 平成5年(1993)4月20日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 7/64

C 11 C 1/04

3/02

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

8114-4B

2115-4H

2115-4H

審査請求 有 請求項の数 8 (全 16 頁)

(21)出願番号

特願平3-283560

(22)出願日

平成3年(1991)10月3日

(71)出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(74)上記1名の復代理人 弁理士 池浦 敏明 (外1名)

(71)出願人 390014557

ボーソー油脂株式会社

東京都中央区日本橋本町1丁目1番8号

(74)上記1名の代理人 弁理士 池浦 敏明

(72)発明者 小杉 佳次

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法

(57)【要約】

【目的】 機能食品などの利用が期待される高度不飽和脂肪酸を高割合で含む油脂を安価な原料油脂から製造する方法を提供する。

【構成】 高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたリバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたリバーゼを用いてトリグリセリドに変換させる工程からなる濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたりバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたりバーゼを用いてトリグリセリドに変換させる工程からなる濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法。

【請求項2】 全反応を不活性気体の雰囲気中で実施する請求項1の方法。

【請求項3】 前記の加水分解を水非混合性軽質溶剤の存在下に実施する請求項1又は2の方法。

【請求項4】 前記の加水分解をシュードモナス属細菌の生産したりバーゼを含む固定化されたりバーゼを用いて実施する請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項5】 前記の高度不飽和濃縮トリグリセリドへの変換をキャンディダ属菌の生産したりバーゼを含む固定化されたりバーゼを用いて実施する請求項5の方法。

【請求項6】 高度不飽和脂肪酸濃縮物とその8～10重量%からなる混合液を、固定化されたりバーゼと接触反応させると同時に副生水を脱水させることを特徴とする高度不飽和脂肪酸濃縮物トリグリセリドの製造方法。

【請求項7】 前記の固定化されたりバーゼがキャンディダ属菌の生産したりバーゼを含む請求項6の方法。

【請求項8】 前記の高度不飽和脂肪酸がω-3高度不飽和脂肪酸である請求項1～7のいずれかの方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は濃縮された高度不飽和脂肪酸油脂、特に、濃縮されたω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。なお、本明細書におけるω-3高度不飽和脂肪酸とは、炭素鎖の末端メチルから第3番目と第4番目の炭素の結合が二重結合であり、かつ炭素鎖中の全二重結合数が2個以上の不飽和脂肪酸を意味する。また、高度不飽和脂肪酸含有油脂とは、全二重結合数が2以上の不飽和脂肪酸トリグリセリドを含む油脂を意味する。

## 【0002】

【従来の技術及びその問題点】 ω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂は、高級飽和脂肪酸油脂が主成分を占める牛脂などとは異り、各種魚類の油、肝油などの海産食品に多く含まれており、最近では、健康食品の成分として知られるアラキドン酸やリノール酸などのω-6高度不飽和脂肪酸とバランス良く摂取することが必要であると言わされている。このバランスをとるため、ω-3高度不飽和脂肪酸のエチルエステルが使用されている。しかしながらこの脂肪酸のエチルエステルは、原油脂すなわち脂肪酸トリグリセリドと比較して消化吸収の程度が低い〔例えばCarol M. Wojenski氏らのBiochem. Biophys. Acta 1081 (1950) 33～38参照〕。一方、魚油等の原料油脂を加水分解してω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮生成させる手段として、酵素を用いる方法が考えられ、リバーゼを用いた場合の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸との分解速度の差を利用する方法〔T. Hoshino, T. YamaneおよびS. Shimizu氏らのAgric. Biol. Chem. 54 (1990), 1459～1467〕あるいはキャンディダ属菌に由来するリバーゼを用いてω-3高度不飽和脂肪酸油脂を選択的に加水分解後、この脂肪酸とグリセリンとを、クロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用で反応させてトリグリセリドを合成することでω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法〔田中、今村および小菅氏らによる「実戦バイオリアクター」、食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合成果論文集(1990年)第391～411頁〕が知られているが、これらの方法においてω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮するプロセスはいずれも原料油脂をリバーゼの作用で選択的に加水分解する工程のみに置かれ、方法全体としては効率的とは言い難い。さらにリバーゼを用いる方法として、いわし油を加水分解し、ω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを用いて同じくクロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用によりこの脂肪酸のトリグリセリドを合成する方法〔長田、高橋、羽田野および細川氏らによる日本水誌57(1991年)、第119～125頁〕が知られているが、この方法によるトリグリセリドの収率は50%以下であって効率的な方法とは言えない。ω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂は前述したように健康食品として摂取することが望まれるが、このものは分子中の不飽和結合部分で酸化され易く、また、二重結合の移動、異性化が起り易くまた価格的にも非常に高価である。したがってω-3高度不飽和脂肪酸を一層高度な割合で含有する油脂を得ることが望まれている。

30

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂、特に、ω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を、この脂肪酸の変性を起すことなく効率的に加水分解し、さらに加水分解生成物からこの高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを作用させて高度に濃縮された高度不飽和脂肪酸のトリグリセリドを製造する方法を提供することをその課題とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは前記課題を解決するため鋭意検究を重ねた結果、本発明を完成した。

【0005】 本発明によれば、高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたりバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたりバ-

2

91) 33～38参照〕。一方、魚油等の原料油脂を加水分解してω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮生成させる手段として、酵素を用いる方法が考えられ、リバーゼを用いた場合の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸との分解速度の差を利用する方法〔T. Hoshino, T. YamaneおよびS. Shimizu氏らのAgric. Biol. Chem. 54 (1990), 1459～1467〕あるいはキャンディダ属菌に由来するリバーゼを用いてω-3高度不飽和脂肪酸油脂を選択的に加水分解後、この脂肪酸とグリセリンとを、クロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用で反応させてトリグリセリドを合成することでω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法〔田中、今村および小菅氏らによる「実戦バイオリアクター」、食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合成果論文集(1990年)第391～411頁〕が知られているが、これらの方法においてω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮するプロセスはいずれも原料油脂をリバーゼの作用で選択的に加水分解する工程のみに置かれ、方法全体としては効率的とは言い難い。さらにリバーゼを用いる方法として、いわし油を加水分解し、ω-3高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを用いて同じくクロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用によりこの脂肪酸のトリグリセリドを合成する方法〔長田、高橋、羽田野および細川氏らによる日本水誌57(1991年)、第119～125頁〕が知られているが、この方法によるトリグリセリドの収率は50%以下であって効率的な方法とは言えない。ω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂は前述したように健康食品として摂取することが望まれるが、このものは分子中の不飽和結合部分で酸化され易く、また、二重結合の移動、異性化が起り易くまた価格的にも非常に高価である。したがってω-3高度不飽和脂肪酸を一層高度な割合で含有する油脂を得ることが望まれている。

20

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂、特に、ω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を、この脂肪酸の変性を起すことなく効率的に加水分解し、さらに加水分解生成物からこの高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを作用させて高度に濃縮された高度不飽和脂肪酸のトリグリセリドを製造する方法を提供することをその課題とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは前記課題を解決するため鋭意検究を重ねた結果、本発明を完成した。

【0008】 本発明によれば、高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたりバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたりバ-

ゼを用いてトリグリセリドに変換させる工程からなる濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法が提供される。高度不飽和脂肪酸は化学的に不安定なために前記の各工程は不活性気体の雰囲気中で実施するのが好ましい。

【0006】本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を微生物由来のリバーゼの作用により選択的に加水分解し、得られた $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いで微生物由来のリバーゼの作用によりグリセリンと反応させてトリグリセライトとすることにより濃縮された $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂を得ることを意図するものである。

【0007】本発明において原料として使用される油脂は、高度不飽和脂肪酸トリグリセリド、特に、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸トリグリセリドを高割合例えれば10重量%以上含有する油脂であり、このような油脂は海産性または淡水産性のプランクトンを捕食している生物、例えば魚類の油脂、一般的に魚油と呼ばれるもので、大量に捕獲できる鯵、さば等の魚油、またはこれら魚類の肝油である。また鯵油のような $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を含有する油脂をエタノールのようなアルコールでアルコール分解したアルコールエステルも本発明の原料として使用できる。

【0008】本発明における前記油脂の加水分解は、アルカリ等の化学的手段を用いることなく、リバーゼ等の酵素を用いて生化学的手段で実施する。リバーゼは、油脂のアシル基を加水分解し、脂肪酸とグリセリンを生成させる。本発明で使用するリバーゼは微生物由来のもの、例えば、シュウドモナス属菌、キャンディダ属菌、クロモバクテリウム属菌等のリバーゼで、特に、シュウドモナス属菌のリバーゼが好適に使用できる。リバーゼは通常担体に固定して使用するのが好適であり、この担体としては陰イオン交換樹脂が好適であり、リバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化した固定化リバーゼは市販品も入手できる。中でもシュウドモナス属の菌に由来するリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定したリバーゼは加水分解の反応物質が流動性を持つ50~60℃の温度においても長時間安定であり、魚油等の油脂の分解性もよく、後記する実施例1に記載したように分解率66%以上に加水分解を行うと $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を効率よく生成するので望ましい分解酵素である。魚油分解の際の化学組成は未分解のトリグリセリド、一部分解のジグリセリドおよび完全分解した脂肪酸であり、モノグリセリドの割合は極めて少ない。このモノグリセリドは界面活性作用が大きいので生成した脂肪酸の分離を困難にするので好ましくないが、このモノグリセリドの量が少ないことは分離効率を高めることになる。また未分解のグリセリドにはエイコサンペンタエン酸が濃縮される傾向を示す。油脂の加水分解率は、脂肪酸にまで分解された油脂の重量%で表わして、70%以上、好ましくは80%

~99重量%である。

【0009】この加水分解を実施するには、反応器に固定したリバーゼを満たし軽質の原料油脂と水とを向流的に接触させる。この際生成した脂肪酸を含む流れとグリセリンおよび水を含む流れとがよく分離するように容器は直立型のものとし、重力によってこれらの流れが向流的に流れるようになるとよい。この際の反応温度は一般に40~70℃であり、50~60℃の温度に保持するのが好ましい。この加水分解反応を実施する際、反応器を不活性気体の雰囲気に保持することが好ましく、不活性気体としては窒素、アルゴン、炭酸ガス、ネオン等を使用することができ、反応器の空気をこれら不活性気体のいずれかで置換する。炭酸ガスおよびアルゴンは比重が大きいので置換処理には便利な気体である。反応帯域を不活性気体の雰囲気にすることにより、高度不飽和脂肪酸中の二重結合が酸素の作用により過酸化結合を生じ過酸化物価が上昇するのが防止できる。また、この反応の際、水より軽質成分の脂肪酸、未反応グリセリド等を分離するのを助長するために水非混和性軽質溶剤を用いることができる。本明細書において「軽質」とは比重的に水より小さい、すなわち水より軽いことを意味する。この水非混和性軽質溶剤には、例えば、インオクタン、オクタン、ペンタン、ヘプタン、ヘキサン等の炭化水素及びその他の疎水性溶剤が挙げられる。この溶剤は反応前に油脂に添加してもよく、また反応の任意の時点で反応系中に加えることができる。この溶剤を添加することにより、低比重生成物として水より分離される生成物の分離が容易になる。反応は連続的にまたは非連続的に実施することができ、回分式で加水分解反応を実施した場合、一般に15~20時間を必要とする。高度不飽和脂肪酸を含む生成物は低比重生成物として、水およびグリセリンを含む高比重生成物から分離される。

【0010】加水分解反応によって得られ、高比重生成物から分離された高度不飽和脂肪酸を含有する低比重生成物は、これを軽質溶剤に溶解してその脂肪酸の濃縮を行うことができる。軽質溶剤の例としては、脂肪酸エステルを生成する恐れのあるアルコール性OH基を分子内に持たない溶剤、例えば、アセトン、メチルエチルケトンのようなケトン、ペンタン、ヘキサン、ペプタン、オクタン、イソオクタンのような炭化水素、その他エーテル類がある。加水分解生成物中に高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルが存在すると、最終工程で高度不飽和脂肪酸をトリグリセリドに変換する際の収率が低下するので、軽質溶剤としてはアルコール性OH基を分子内に持たない前記のような溶剤を使用する。

【0011】高度不飽和脂肪酸の濃縮はそれ自体周知の方法で実施され、例えば低温分別結晶法、塩形成法、尿素付加法、吸着分離法などが使用される。この濃縮工程も不活性気体の雰囲気で実施して高度不飽和脂肪酸の酸化による変成を防止することが望ましい。

【0012】加水分解時に水非混和性軽質溶剤を用いた場合には、溶剤の回収を簡単にするために、濃縮時に用いる溶剤は、それと同一の溶剤であることが望ましいが、加水分解時と濃縮時とで異った溶剤を用いることも可能である。この濃縮工程において高度不飽和脂肪酸の濃度は濃縮前の濃度の約2～6倍に濃縮することができる。

【0013】溶剤を蒸発させることによって得られた高度不飽和脂肪酸濃縮物は次にグリセリンと反応（エステル化）させてトリグリセリドに変換させる。このトリグリセリド合成において生成した水はエステル化と同時に脱水処理によって除去する。この合成反応は固定化されたりバーゼとの接触反応によって実施される。この固定化されたりバーゼは水分含有量が100ppm以下のほぼ無水状態でも活性を維持でき、高度不飽和脂肪酸トリグリセリドの合成に好適なものである。このような固定化されたりバーゼには、例えばカンディダ属菌に由来するリバーゼをアクリル樹脂に固定化したもの、ムコール属菌に由来するリバーゼをマクロポーラスな陰イオン交換樹脂に固定化したもの等が挙げられる。またほぼ無水の状態でも活性が維持できるようにレシチンやポリオールの存在下に固定化したシュウモナス属菌やクロモバクテリウム属菌由来のリバーゼも使用することができる。ムコール属菌に由来するリバーゼも使用することができるが、ドコサヘキサエン酸トリグリセリドの合成は良くない。なお高度不飽和脂肪酸濃縮物中にアルコールエステルが存在する場合にはリバーゼの基質特異性により、遊離脂肪酸を用いた場合と比較してトリグリセリドの収率が悪くなる。したがって本発明における加水分解工程、濃縮工程で用いる溶剤の選択には注意を要する。

【0014】このトリグリセリドの合成に際して使用されるグリセリンは、この反応の化学量論量付近である。高度不飽和脂肪酸が反応中に変成するのを考慮して脂肪酸の分子量から計算すると、使用する高度不飽和脂肪酸濃縮物の8～10重量%の量のグリセリンが使用される。

【0015】本発明における固定化リバーゼの接触反応と同時に行われる脱水処理は真空脱水方式または乾燥不活性ガスの通気方式が採用される。この際反応系に存在する水分および固化されたりバーゼの作用でグリセリンと高度不飽和脂肪酸濃縮物との反応によって生成した水分が共に脱水され、反応系内の水分濃度をほぼ無水の100ppm以下にする。このトリグリセリド合成反応においてアルコールエステルが存在すると前述したようにリバーゼの基質特異性によりトリグリセリドの収率が低下するため、原料を活性炭充填カラムに通して脱アルコール処理することが必要となる。

【0016】前記のトリグリセリド合成反応に際して、反応温度は高度不飽和脂肪酸中の二重結合の移動等を防止するため低い方が好ましいが、酵素反応であることを

考慮し、その効率性から30～60℃、望ましくは40～60℃である。反応に要する時間は温度その他の条件にもよるが一般に24～48時間である。

【0017】前記の反応により得られた高度不飽和脂肪酸トリグリセリドは種々の方法、例えば、カラム処理により精製できる。溶剤としてエーテルやヘキサンを用い、塩基性アルミナ充填カラムまたはマグネシウムで活性化したシリカゲル充填カラムにより精製を行うと過酸化物も除去されたトリグリセリドが得られるので好都合である。前記のトリグリセリド合成反応によって得られる生成物の80%以上が高度不飽和脂肪酸トリグリセリドである。この生成物をエーテルを溶剤として塩基性アルミナ充填カラムで処理し、吸着物をエーテル溶出液として処理し、この溶出液を蒸発させると約99%以上の高純度の高度不飽和脂肪酸トリグリセリドが得られる。高度不飽和脂肪酸中にアルコールエステルが混在するとトリグリセリドの収量が悪くなり、また、トリグリセリド合成も脱アルコール処理を同時に実行が必要が生じるようになり、反応操作が複雑になる。この工程も不活性気体の雰囲気中で実施するのが望ましい。

【0018】本発明方法の好適な一例によれば、シュウモナス属の細菌に由来するリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化して製造した固定化リバーゼの作用により、鯖油のようなω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を分解率80%以上まで加水分解することにより遊離のω-3高度不飽和脂肪酸を80%以上含有する低比重分解産物を得られる。この際未分解のグリセリドには界面活性の大きいモノグリセリドが含まれずしかもエイコサペンタエン酸が濃縮されていた。また原料のω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を水非混和性軽質溶剤としてイソオクタンに溶解して加水分解を行うと、酵素的油脂加水分解に悪影響を与える油分と水分との分離が促進され、工程を連続的に実施した場合、生成物である低比重分解産物の回収過程が容易になる。こうして得られたω-3高度不飽和脂肪酸を含む生成物をアルコール性OH基を持たない溶剤に溶解し、濃縮を行うことによりその脂肪酸のエステル化を防止することができる。次にキャンディタ属菌の生産したリバーゼを例えアクリル樹脂に固定化して製造した固定化リバーゼを用いて濃縮されたω-3高度不飽和脂肪酸とグリセリンを反応させるとドコサヘキサエン酸のようなω-3高度不飽和脂肪酸トリグリセライドが効率よく合成できる。

【0019】

【実施例】次に本発明の方法を実施例を挙げてさらに詳しく説明する。

【0020】実施例1

シュウモナス フルオレセンス (*Pseudomonas flourescens*)バイオタイプIにより生産されたリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化したもの（エンチロンPF、落東化成社製)1g、鯖油1gおよび水1gを50mlの三角フラスコ

にとり、シリコン栓をつけて50°Cで振とうした。各反応時間で脂肪酸画分をガスクロマトグラフィー (WCOT CP-Sil88 Chrompack社製) にかけ脂肪酸分析した結果を表1に示す。分解率は酸価と鹼化価との比より求めた。表1をみると、分解率66%以上分解すればメタノール分解と同じ程度の炭素数20で、二重結合を5個有するエ\*

\*イコサベンタエン酸 (C20:5) および炭素数22で、二重結合を6個有するドコサヘキサエン酸 (C22:6) が得られることが解った。

## 【0021】

【表1】

脂肪酸	反応時間					メタノール 分解物
	1時間	3時間	5時間	15時間	48時間	
	41%	54%	66%	80%	93%	
C14	4.4%	3.1%	3.2%	3.1%	2.8%	3.0%
C16	25.4	19.1	14.9	16.8	16.2	17.4
C16:1	10.0	7.0	6.6	6.9	6.8	6.9
C18:0	5.1	4.8	4.4	4.1	4.4	4.6
C18:1	33.6	28.3	27.8	27.3	29.3	28.6
C18:2	9.0	8.0	7.9	7.9	8.0	7.3
C20:1	4.4	4.7	4.5	4.7	4.7	4.6
C20:5	1.8	3.8	5.8	5.9	6.6	6.5
C22:6	2.3	7.3	9.8	9.2	9.3	9.1

## 【0022】実施例2

図1に示す反応器を用意した。この反応器は向流接触型の二相系反応器である。仕切り板5及びエマルジョン破壊装置10は75ミクロンの編目を持つステンレススチールメッシュの付切り板である。図面には示していないが反応槽はマントルにより囲まれて恒温の液体を導入、排出させることにより、温度が一定に保たれるようになっている。上端と下端に円錐状の静置槽2、8を設け、上端の静置槽2の上端部に低比重生成物排出管1があり、下端の静置槽8には高比重生成物排出管9がある。中間の6個の攪拌槽のうち上端の攪拌槽には高比重基質供給管3があり、下端の攪拌槽には低比重基質供給管7がある。各槽の直径が50mm、高さは26~30mmで上下の静置槽まで含めた反応器内の体積は421mlであった。6個の攪拌槽4に加えた固定化酵素(エンチロンP.F.)量は、合計で64.6gであった。高比重生成物排出管9には120度の方向に三方に分かれた分歧管を有する継ぎ手がその分歧管の1つを介してつながり、残りの一方の分歧管11はパルス発生機6につながれ、残りの他方の分歧管12には送液ポンプが接続されている。パルス発生機6は1分間に15回ずつ脈流が流れている。1回の脈流の大きさは約

15mlである。この脈流は攪拌槽内容物を混合させる作用を示す。高比重生成物排出管9を閉じて高比重基質供給管3より水、低比重基質供給管7より鰈油を両者が約1:1になるように反応器内に基質を満たし、送液ポンプは止めたままパルス発生機6のみを一晩動かすと二相分離が達成される。なお図示していないが基質は窒素ガスで飽和にしたのち窒素ガス加圧下の容器に保存する。パルス発生機6を作動しながら低比重基質供給管7より鰈油を5ml/時間、高比重基質供給管3より水を2.5ml/時間で供給し、高比重生成物排出管9より120~190mg/mlのグリセリンを含む高比重生成物を1~3ml/時間で回収してやると、低比重生成物が3~5ml/時間で回収された。低比重生成物は窒素で容器中の大気を置換した-90°Cの容器に保存した。上記のような条件で反応器を840時間運転したのち、条件を変えて鰈油に水非混和性軽質溶剤として30%のヘキサンを加えて296時間、30%のイソオクタンを加えて240時間および最初と同じ条件であるが反応時間を96時間にして運転した。その結果を表2に示す。

## 【0023】

【表2】

条件	反応時間	分解率	TG	DG	MG	FG	油水分離
無溶媒	840時間	80~82%	10%	8%	—	82%	
ヘキサン	296	70~75	17	12	1%	72	悪い
イソオクタン	240	81	14	8	—	78	良好
無溶媒	96	74~75	20	16	—	64	

【0024】表2のTGは未反トリグセリド、DGはジグリセリド、MGはモノグリセリド、FAは脂肪酸を表し、HPLCカラム(SHODEX GPC Kf-802昭和電工社製300×3)で求めた。イソオクタンを添加すると無溶媒に比較すると6~7%分解率も上昇し油水分離も良好であった。また前記の固定化リバーゼによると油水分離に悪影響を及ぼす界面活性作用の強いモノグリセリドの生成も少なかった。

【0025】また以下の表3には鰤油及び無溶媒の分解産物(分解率81%)中の脂肪酸組成を示す。グリセリ\*

\*ド及び脂肪酸画分は、分解産物を薄層クロマトグラフィーにより分画した。表2および表3をみると未分解のジグリセリド部分(DC)にはω-3のエイコサペンタノ酸(C20:5)、ドコサペンタエン酸(C22:5)、およびドコサヘキサエン酸(C22:6)が濃縮されているが、これは低比重生成物中に回収される。なお表3中、下線を付した数値はω-3高度不飽和脂肪酸についてのものである。

【0026】

【表3】

脂肪酸	脂肪酸画分	グリセリド画分	鰤油
C14	3.0%	3.0%	3.0%
C16	19.9	15.3	17.4
C16:1	6.0	6.6	6.9
C18:0	5.3	4.8	4.6
C18:1	29.9	27.4	28.6
C18:2	7.7	6.6	7.3
C20:1	4.6	4.6	4.6
C20:5	4.5	9.3	6.5
C22:5	1.6	2.6	2.1
C22:6	7.7	10.6	9.1

### 【0027】実施例3

実施例2の無溶媒の低比重生成物(分解率81%)にヘキサンを加え無水硫酸ナトリウムで脱水し、ヘキサンを蒸散させた分解産物35gに、低温分別結晶法による濃縮のため軽質溶剤として7倍量のアセトンを加え、-50℃で一晩放置後濾過し、-50℃にしたアセトンで洗浄し濾液及び洗液のアセトンを蒸散させ1次濃縮物18.72gを得た。再び7倍量のアセトンを加え-80℃で一晩放置後同様にして2次濃縮物10.31gを得た。2次濃縮物1gにグリセリン0.0714gをリポザイムIM60を0.1g加え、10~20トル(Torr)まで脱気し真空乾燥しながら、60℃で振とう反応した。リポザイムIM60(Novo社製)はムコール・ミーハイの生産したリバーゼをマクロ細孔の陰イオン交換樹脂に固定化したものである。48時間後の反応物の組成は、トリグリセリド61.2%、ジグリセリド

22.0%、モノグリセリド2.8%および脂肪酸13.9%であった。この反応物をエチルエーテルに溶かし固定化酵素を濾別した後、塩基性アルミナカラム(アルミニウムオキシド90(メルク社製製品番号1076)およびアルカリ脱酸法により精製した。各段階の組成および脂肪酸組成を、表4に示す。表中、下線を付した数値はいずれもω-3高度不飽和脂肪酸についてのものであり、特にエイコサペンタエン酸およびドコサペンタエン酸の場合にはアセトンによる低温分別結晶法による濃縮の結果、第2次濃縮物にいずれも2倍濃縮されていることが判る。またこれらの脂肪酸はグリセリンとの反応によりドコヘキサエン酸(C22:6)の取込みが若干悪いがトリグリセリドに変換されることを示している。

【0028】

【表4】

項目	低比重生成物	2次濃縮物	トリグリセリド
<b>組成</b>			
T G	<b>9.6%</b>	<b>8.8%</b>	<b>89.8%</b>
D G	<b>8.9</b>	<b>10.4</b>	
M G		<b>2.2</b>	<b>1.5</b>
F A	<b>81.6</b>	<b>78.6</b>	<b>8.6</b>
<b>脂肪酸組成</b>			
C14	<b>3.1%</b>	<b>1.2%</b>	<b>1.4%</b>
C16	<b>17.4</b>	<b>1.0</b>	<b>1.3</b>
C16:1	<b>7.0</b>	<b>8.9</b>	<b>10.8</b>
C18:0	<b>4.8</b>	<b>0.9</b>	<b>1.1</b>
C18:1	<b>28.8</b>	<b>16.3</b>	<b>19.6</b>
C18:2	<b>7.8</b>	<b>14.9</b>	<b>17.8</b>
C20:1	<b>4.7</b>	<b>3.4</b>	<b>2.9</b>
C20:5	<b>6.2</b>	<b>14.4</b>	<b>15.2</b>
C22:5	<b>2.0</b>	<b>4.5</b>	<b>4.7</b>
C22:6	<b>9.2</b>	<b>20.8</b>	<b>11.9</b>

## 【0029】実施例4

実施例2のイソオクタン添加の低比重生成物（分解率81%）にイソオクタンを蒸散させた加水分解物190gに塩形成法による濃縮のために軽質溶剤として7倍量のアセトン1330gおよび4規定の水酸化カリウムメタノール溶液202mlを加え30分間室温で攪拌し-20℃に16時間放置した。次いでカリウム塩として沈殿する部分を除き濾液58.2gに対し、582gのアセトンを加えて、-20℃に16時間放置した。沈殿する部分を除き濾液を4規定の塩酸で酸性にしアセトンを蒸散させたのちヘキサンを加え洗液がpH7なるまで水洗した。ヘキサンを蒸散させて24.4gのω-3高度不飽和脂肪酸濃縮物を得た。この濃縮物1gにグリセリン

0.09gおよび固定化リバーゼsp382を0.1gを加え、60℃で24時間10~20トル(Torr)まで脱気し、真空乾燥しながら60℃で振とう反応した。固定化リバーゼsp382(Novo社製)はキャリデダ・アンタクチカの生産するリバーゼをアクリル樹脂に固定化したものである。24時間後のこの反応物の組成は、トリグリセリド68.3%、ジグリセリド24.7%、モノグリセリド3.7%および脂肪酸3.3%であった。この反応物をエチルエーテルに溶かし固定化酵素を濾別した後、塩基性アルミニカラムにより精製した。各段階の組成および脂肪酸組成を、表5に示す。

【0030】

【表5】

項目	低比重生産物	濃縮物	トリグリセリド
<b>組成</b>			
TG	10.0%	0.0%	99.1%
DG	7.2	0.0	0.0
MG	0.0	0.0	0.0
FA	82.8	100	0.7
<b>脂肪酸組成</b>			
C14	3.5%	1.7%	1.4%
C16	19.4	0.3	0.3
C16:1	7.1	2.6	0.6
C18:0	4.5	0.4	0.3
C18:1	30.6	2.9	2.7
C18:2	7.5	4.9	5.9
C20:1	3.3	5.2	4.2
C20:5	5.8	27.6	24.9
C22:5	1.7	5.5	5.7
C22:6	7.9	38.0	31.1

【0031】表中、下線を付した数値は $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸についてのものである。本方法によると、トリグリセライド合成の際の酵素としてキャンディダ属の菌由来のリバーゼを用いているので、ドコサヘキサエン酸(C<sub>22</sub>:6)のトリグリセリドへの取り込みが良くトリグリセリド合成量も6.8、3%と良いものであった。

### 【0032】

【発明の効果】 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸は、循環器系疾病の予防効果、ラットの学習能力の向上効果等重要な生理的意義がある。本発明によれば、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を豊富に含み多量に供給入手が可能な魚油等の油脂を原料として、酵素反応を利用して $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂を一旦加水分解して脂肪酸とし、これを低温分別結晶法などの濃縮方法により他の脂肪酸などから分離濃縮し、再度酵素反応を利用してグリセリンと反応させることにより、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸トリグリセリド油脂を効率良く得ることができる。この際の原料油脂は安価であり、反応はすべて緩和な条件下で実施でき、しかも $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を実質的な変成を起

すことなく高度に濃縮できる。従って本発明は単に機能性食品としての利用ばかりでなく医学的および薬学的な応用にたいしても寄与するものである。

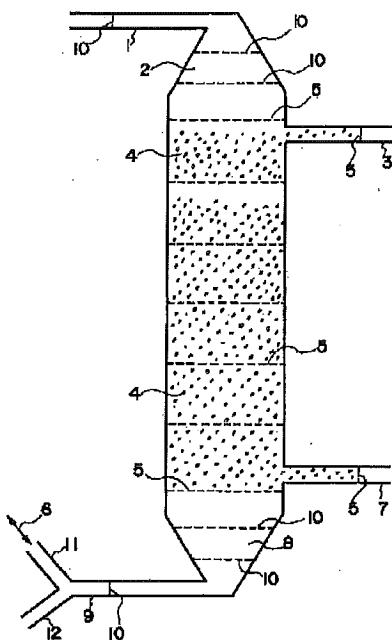
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】向流接觸型の二相系固定化酵素充填反応器の説明断面図である。

#### 【符号の説明】

1. 低比重生産物排出管
2. 上端の静置層
3. 高比重基質供給管
4. 搅拌槽
5. 仕切り板
6. パルス発生機
7. 低比重基質供給管
8. 下端の静置層
9. 高比重生産物排出管
10. エマルジョン破壊装置
11. パルス発生機につながれた分岐管
12. 定量ポンプにつながれた分岐管

【図1】



## 【手続補正書】

【提出日】 平成3年12月2日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

## 【補正内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたリバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたリバーゼを用いてトリグリセリドに変換させる工程からなる濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法。

【請求項2】 全反応を不活性気体の雰囲気中で実施する請求項1の方法。

【請求項3】 前記の加水分解を水非混合性軽質溶剤の存在下に実施する請求項1又は2の方法。

【請求項4】 前記の加水分解をシュードモナス属細菌の生産したリバーゼを含む固定化されたリバーゼを用いて実施する請求項1～3のいずれかの方法。

【請求項5】 前記の高度不飽和脂肪酸含有油脂への変

換をキャンディダ属菌の生産したリバーゼを含む固定化されたリバーゼを用いて実施する請求項1の方法。

【請求項6】 高度不飽和脂肪酸濃縮物とその8～10重量%のグリセリンからなる混合液を、固定化されたリバーゼと接触反応させると同時に副生水を脱水させることを特徴とする高度不飽和脂肪酸濃縮物トリグリセリドの製造方法。

【請求項7】 前記の固定化されたリバーゼがキャンディダ属菌の生産したリバーゼを含む請求項6の方法。

【請求項8】 前記の高度不飽和脂肪酸が $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸である請求項1～7のいずれかの方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は濃縮された高度不飽和脂肪酸油脂、特に、濃縮された $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。なお、本明細書における $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸とは、炭素鎖の末端メチルから第3番目と第4番目の炭素の結合が二重結合であり、かつ炭素鎖中の全二重結合数が2個以上の不飽和脂肪酸を意味する。また、高度不飽和脂肪酸含有油脂とは、全二重結合数が2以上の不飽和脂肪酸トリグリセリドを含む油脂を意味する。

## 【0002】

【従来の技術及びその問題点】  $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂は、C<sub>18</sub>脂肪酸油脂が主成分を占める牛脂など

とは異り、各種魚類の油、肝油などの海産食品に多く含まれており、最近では、健康食品の成分として知られるアラキドン酸やリノール酸などの $\omega-6$ 高度不飽和脂肪酸とバランス良く摂取することが必要であると言われている。このバランスをとるため、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸のエチルエステルが使用されている。しかしながらこの脂肪酸のエチルエステルは、原料油脂すなわち脂肪酸トリグリセリドと比較して消化吸収の程度が低い〔例えばCaro1 M. Wojenshi氏らのBioc hem. Biophys. Acta 1081 (1991) 33~38参照〕。一方、魚油等の原料油脂を加水分解して $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮生成させる手段として、酵素を用いる方法が考えられ、リバーゼを用いた場合の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸との分解速度の差を利用する方法〔T. Hoshino, T. YamaneおよびS. Shimizu氏らのAgric. Biol. Chem. 54 (1990), 1459~1467〕あるいはキャンディダ属菌に由来するリバーゼを用いて $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸油脂を選択的に加水分解後、この脂肪酸とグリセリンとを、クロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用で反応させてトリグリセリドを合成することで $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮する方法〔田中、今村および小菅氏らによる「実践バイオリアクター」、食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合成果論文集(1990年)第391~411頁〕が知られているが、これらの方法において $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮するプロセスはいずれも原料油脂をリバーゼの作用で選択的に加水分解する工程のみに置かれ、方法全体としては効率的とは言い難い。さらにリバーゼを用いる方法として、いわし油を加水分解し、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを用いて同じくクロモバクテリウム属の細菌に由来するリバーゼの作用によりこの脂肪酸のトリグリセリドを合成する方法〔長田、高橋、羽田野および細川氏らによる日水誌57(1991年)、第119~125頁〕が知られているが、この方法によるトリグリセリドの収率は50%以下であって効率的な方法とは言えない。 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂は前述したように健康食品として摂取することが望まれるが、このものは分子中の不飽和結合部分で酸化され易く、また、二重結合の移動、異性化が起り易くまた価格的にも非常に高価である。したがって $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を一層高度な割合で含有する油脂を得ることが望まれている。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂、特に、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂を、この脂肪酸の変性を起すことなく効率的に加水分解し、さらに加水分解生成物からこの高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いでグリセリンを作用させて高度に濃縮された高度不飽和脂肪酸のトリグリセリドを製造する方法

を提供することをその課題とする。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記課題を解決するため鋭意検究を重ねた結果、本発明を完成した。

【0005】本発明によれば、高度不飽和脂肪酸含有油脂または高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルを固定化されたりバーゼを用いて加水分解する工程、得られた加水分解生成物に含まれる高度不飽和脂肪酸を濃縮する工程及び高度不飽和脂肪酸濃縮物を固定化されたりバーゼを用いてトリグリセリドに変換させる工程からなる濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法が提供される。高度不飽和脂肪酸は化学的に不安定なために前記の各工程は不活性ガスの雰囲気中で実施するのが好ましい。

【0006】本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を微生物由来のリバーゼの作用により選択的に加水分解し、得られた $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を濃縮し、次いで微生物由来のリバーゼの作用によりグリセリンと反応させてトリグリセリドとすることにより濃縮された $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂を得ることを意図するものである。

【0007】本発明において原料として使用される油脂は、高度不飽和脂肪酸トリグリセリド、特に、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸トリグリセリドを高割合例えは10重量%以上含有する油脂であり、このような油脂は海産性または淡水産性のプランクトンを捕食している生物、例えば魚類の油脂、一般的に魚油と呼ばれるもので、大量に捕獲できる鯵、さば等の魚油、またはこれら魚類の肝油である。また鯵油のような $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を含有する油脂をエタノールのようなアルコールでアルコール分解したアルコールエステルも本発明の原料として使用できる。

【0008】本発明における前記油脂の加水分解は、アルカリ等の化学的手段を用いることなく、リバーゼ等の酵素を用いて生化学的手段で実施する。リバーゼは、油脂のアシル基を加水分解し、脂肪酸とグリセリンを生成させる。本発明で使用するリバーゼは微生物由来のもの、例えば、シュウドモナス属菌、キャンディダ属菌、クロモバクテリウム属菌等のリバーゼで、特に、シュウドモナス属菌のリバーゼが好適に使用できる。リバーゼは通常担体に固定して使用するのが好適であり、この担体としては陰イオン交換樹脂が好適であり、リバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化した固定化リバーゼは市販品も入手できる。中でもシュウドモナス属の菌に由来するリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定したリバーゼは加水分解の反応物質が流動性を持つ50~60℃の温度においても長時間安定であり、魚油等の油脂の分解性もよく、後記する実施例1に記載したように分解率66%以上に加水分解を行うと $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を効率よ

く生成するので望ましい分解酵素である。魚油分解の際の化学組成は未分解のトリグリセリド、一部分解のジグリセリドおよび完全分解した脂肪酸であり、モノグリセリドの割合は極めて少ない。このモノグリセリドは界面活性作用が大きいので生成した脂肪酸の分離を困難にするので好ましくないが、このモノグリセリドの量が少ないことは分離効率を高めることになる。また未分解のグリセリドにはエイコサンペンタエン酸が濃縮される傾向を示す。油脂の加水分解率は、脂肪酸にまで分解された油脂の重量%で表わして、70%以上、好ましくは80~99重量%である。

【0009】この加水分解を実施するには、反応器に固定したリバーゼを満たし軽質の原料油脂と水とを向流的に接触させる。この際生成した脂肪酸を含む流れとグリセリンおよび水を含む流れとがよく分離するように容器は直立型のものとし、重力によってこれらの流れが向流的に流れるようにするとよい。この際の反応温度は一般に40~70℃であり、50~60℃の温度に保持するのが好ましい。この加水分解反応を実施する際、反応器を不活性気体の雰囲気に保持することが好ましく、不活性気体としては窒素、アルゴン、炭酸ガス、ネオン等を使用することができ、反応器の空気をこれら不活性気体のいずれかで置換する。炭酸ガスおよびアルゴンは比重が大きいので置換処理には便利な气体である。反応帯域を不活性気体の雰囲気にすることにより、高度不飽和脂肪酸中の二重結合が酸素の作用により過酸化結合を生じ過酸化物価が上昇するのが防止できる。また、この反応の際、水より軽質成分の脂肪酸、未反応グリセリド等を分離するのを助長するために水非混和性軽質溶剤を用いることができる。本明細書において「軽質」とは比重的に水より小さい、すなわち水より軽いことを意味する。この水非混和性軽質溶剤には、例えば、インオクタン、オクタン、ペンタン、ヘプタン、ヘキサン等の炭化水素及びその他の疎水性溶剤が挙げられる。この溶剤は反応前に油脂に添加してもよく、また反応の任意の時点で反応系中に加えることができる。この溶剤を添加することにより、低比重生産物として水より分離される生成物の分離が容易になる。反応は連続的または非連続的に実施することができ、回分式で加水分解反応を実施した場合、一般に15~20時間を必要とする。高度不飽和脂肪酸を含む生成物は低比重生産物として、水およびグリセリンを含む高比重生産物から分離される。

【0010】加水分解反応によって得られ、高比重生産物から分離された高度不飽和脂肪酸を含有する低比重生産物は、これを軽質溶剤に溶解してその脂肪酸の濃縮を行うことができる。軽質溶剤の例としては、脂肪酸エステルを生成する恐れのあるアルコール性OH基を分子内に持たない溶剤、例えば、アセトン、メチルエチルケトンのようなケトン、ペンタン、ヘキサン、ペプタン、オクタン、イソオクタンのような炭化水素、その他エーテ

ル類がある。加水分解生成物中に高度不飽和脂肪酸のアルコールエステルが存在すると、最終工程で高度不飽和脂肪酸をトリグリセリドに変換する際の収率が低下するので、軽質溶剤としてはアルコール性OH基を分子内に持たない前記のような溶剤を使用する。

【0011】高度不飽和脂肪酸の濃縮はそれ自体周知の方法で実施され、例えば低温分別結晶法、塩形成法、尿素付加法、吸着分離法などが使用される。この濃縮工程も不活性気体の雰囲気で実施して高度不飽和脂肪酸の酸化による変形を防止することが望ましい。

【0012】加水分解時に水非混和性軽質溶剤を用いた場合には、溶剤の回収を簡単にするために、濃縮時に用いる溶剤は、それと同一の溶剤であることが望ましいが、加水分解時と濃縮時とで異った溶剤を用いることも可能である。この濃縮工程において高度不飽和脂肪酸の濃度は濃縮前の濃度の約2~6倍に濃縮することができる。

【0013】溶剤を蒸発させることによって得られた高度不飽和脂肪酸濃縮物は次にグリセリンと反応（エステル化）させてトリグリセリドに変換させる。このトリグリセリド合成において生成した水はエステル化と同時に脱水処理によって除去する。この合成反応は固定化されたリバーゼとの接触反応によって実施される。この固定化されたリバーゼは水分含有量が100ppm以下のほぼ無水状態でも活性を維持でき、高度不飽和脂肪酸トリグリセリドの合成に好適なものである。このような固定化されたリバーゼには、例えばキャンディダ属菌に由来するリバーゼをアクリル樹脂に固定化したもの、ムコール属菌に由来するリバーゼをマクロポーラス陰イオン交換樹脂に固定化したもの等が挙げられる。またほぼ無水の状態でも活性が維持できるようにレシチンやポリオールの存在下に固定化したシュウドモナス属菌やクロモバクテリウム属菌由来のリバーゼも使用することができる。ムコール属菌に由来するリバーゼも使用することができるが、ドコサヘキサエン酸トリグリセリドの合成は良くない。なお高度不飽和脂肪酸濃縮物中にアルコールエステルが存在する場合にはリバーゼの基質特異性により、遊離脂肪酸を用いた場合と比較してトリグリセリドの収率が悪くなる。したがって本発明における加水分解工程、濃縮工程で用いる溶剤の選択には注意を要する。

【0014】このトリグリセリドの合成に際して使用されるグリセリンは、この反応の化学量論量付近である。高度不飽和脂肪酸が反応中に変成するのを考慮して脂肪酸の分子量から計算すると、使用する高度不飽和脂肪酸濃縮物の8~10重量%の量のグリセリンが使用される。

【0015】本発明における固定化リバーゼの接触反応と同時に行われる脱水処理は真空脱水方式または乾燥不活性気体の通気方式が採用される。この際反応系に存在する水分および固化されたリバーゼの作用でグリセリン

と高度不飽和脂肪酸濃縮物との反応によって生成した水分が共に脱水され、反応系内の水分濃度をほぼ無水の100 ppm以下にする。このトリグリセリド合成反応においてアルコールエステルが存在すると前述したようにリバーゼの基質特異性によりトリグリセリドの収率が低下し、また副生するアルコールを活性炭充填カラムに通して脱アルコール処理することが必要となる。

【0016】前記のトリグリセリド合成反応に際して、反応温度は高度不飽和脂肪酸中の二重結合の移動等を防止するため低い方が好ましいが、酵素反応であることを考慮し、その効率性から30~60℃、望ましくは40~60℃である。反応に要する時間は温度その他の条件にもよるが一般に24~48時間である。

【0017】前記の反応により得られた高度不飽和脂肪酸トリグリセリドは種々の方法、例えば、カラム処理により精製できる。溶剤としてエーテルやヘキサンを用い、塩基性アルミナ充填カラムまたはマグネシウムで活性化したシリカゲル充填カラムにより精製を行うと過酸化物も除去されたトリグリセリドが得られるので好都合である。前記のトリグリセリド合成反応によって得られる生成物の80%以上が高度不飽和脂肪酸トリグリセリドである。この生成物をエーテルを溶剤として塩基性アルミナ充填カラムで処理し、吸着物を除去したエーテル溶出液として処理し、この溶出液を蒸発させると約99%以上の高純度の高度不飽和脂肪酸トリグリセリドが得られる。高度不飽和脂肪酸中にアルコールエステルが混在するとトリグリセリドの収量が悪くなり、また、トリグリセリド合成も脱アルコール処理を同時に行う必要が生じるようになり、反応操作が複雑になる。この工程も不活性気体の雰囲気中で実施するのが望ましい。

【0018】本発明方法の好適な一例によれば、シュウドモナス属の細菌に由来するリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化して製造した固定化リバーゼの作用により、鰯油のようなω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を分解率80%以上まで加水分解することにより遊離のω-3高度不飽和脂肪酸を80%以上含有する低比重分解産物が

得られる。この際未分解のグリセリドには界面活性の大きいモノグリセリドが含まれずしかもエイコサペンタエン酸が濃縮されていた。また原料のω-3高度不飽和脂肪酸含有油脂を水非混和性軽質溶剤としてイソオクタンに溶解して加水分解を行うと、酵素的油脂加水分解に悪影響を与える油分と水分との分離が促進され、工程を連続的に実施した場合、生成物である低比重分解産物の回収過程が容易になる。こうして得られたω-3高度不飽和脂肪酸を含む生成物をアルコール性OH基を持たない溶剤に溶解し、濃縮を行うことによりその脂肪酸のエステル化を防止することができる。次にキャンディタ属菌の生産したリバーゼを例えばアクリル樹脂に固定化して製造した固定化リバーゼを用いて濃縮されたω-3高度不飽和脂肪酸とグリセリンを反応させるとドコサヘキサエン酸のようなω-3高度不飽和脂肪酸もトリグリセライドに効率よく合成できる。

#### 【0019】

【実施例】次に本発明の方法を実施例を挙げてさらに詳しく説明する。

#### 【0020】実施例1

シュウドモナス フルオレセンス (*Pseudomonas flourescens*)バイオタイプIにより生産されたリバーゼを陰イオン交換樹脂に固定化したもの(エンチロンPF、洛東化成社製)1g、鰯油1gおよび水1gを50mlの三角フラスコにとり、シリコン栓をつけて50℃で振とうした。各反応時間で脂肪酸画分をガスクロマトグラフィー(WCOT CP-Sil188 Chrompack社製)にかけ脂肪酸分析した結果を表1に示す。分解率は酸価と鹼化価との比より求めた。表1をみると、分解率6.6%以上分解すればメタノール分解と同じ程度の炭素数20で、二重結合を5個有するエイコサペンタエン酸(C20:5)および炭素数22で、二重結合を6個有するドコサヘキサエン酸(C22:6)が得られることが解った。

#### 【0021】

【表1】

脂肪酸	反応時間					メタノール 分解物
	1時間	3時間	5時間	15時間	48時間	
	41%	54%	66%	80%	93%	
C14	4.4%	8.1%	3.2%	3.1%	2.8%	3.0%
C16	25.4	19.1	14.9	16.8	16.2	17.4
C16:1	10.0	7.0	6.6	6.9	6.8	6.9
C18:0	5.1	4.8	4.4	4.1	4.4	4.6
C18:1	33.6	28.3	27.8	27.3	29.3	28.6
C18:2	9.0	8.0	7.9	7.9	8.0	7.3
C20:1	4.4	4.7	4.5	4.7	4.7	4.6
C20:5	1.8	3.8	5.8	5.9	6.6	6.5
C22:6	2.3	7.3	9.8	9.2	9.3	9.1

## 【0022】実施例2

図1に示す反応器を用意した。この反応器は向流接触型の二相系反応器である。仕切り板5及びエマルジョン破壊装置10は75ミクロンの編目を持つステンレススチールメッシュの付切り板である。図面には示していないが反応槽はマントルにより囲まれて恒温の液体を導入、排出させることにより、温度が一定に保たれるようになっている。上端と下端に円錐状の静置槽2、8を設け、上端の静置槽2の上端部に低比重生成物排出管1があり、下端の静置槽8には高比重生成物排出管9がある。中間の6個の攪拌槽のうち上端の攪拌槽には高比重基質供給管3があり、下端の攪拌槽には低比重基質供給管7がある。各槽の直径が50mm、高さは26~30mmで上下の静置槽まで含めた反応器内の体積は421mlであった。6個の攪拌槽4に加えた固定化酵素(エンチロンP F)量は、合計で64.6gであった。高比重生成物排出管9には120度の方向に三方に分かれた分岐管を有する継ぎ手がその分岐管の1つを介してつながり、残りの一方の分岐管11はパルス発生機6につながれ、残りの他方の分岐管12には送液ポンプが接続されている。パルス発生機6は1分間に15回ずつ脈流が流れている。1回の脈流の大きさは約\*

\* 15mlである。この脈流は攪拌槽内容物を混合させる作用を示す。高比重生成物排出管9を閉じて高比重基質供給管3より水、低比重基質供給管7より鰯油を両者が約1:1になるように反応器内に基質を満たし、送液ポンプは止めたままパルス発生機6のみを一晩動かすと二相分離が達成される。なお図示していないが基質は窒素ガスで飽和にしたのち窒素ガス加圧下の容器に保存する。パルス発生機6を作動しながら低比重基質供給管7より鰯油を5ml/時間、高比重基質供給管3より水を2.5ml/時間で供給し、高比重生成物排出管9より120~190mg/mlのグリセリンを含む高比重生成物を1~3ml/時間で回収してやると、低比重生成物が3~5ml/時間で回収された。低比重生成物は窒素で容器中の大気を置換した-90℃の容器に保存した。上記のような条件で反応器を840時間運転したのち、条件を変えて鰯油に水非混和性軽質溶剤として30%のヘキサンを加えて296時間、30%のイソオクタンを加えて240時間および最初と同じ条件であるが反応時間を96時間にして運転した。その結果を表2に示す。

## 【0023】

【表2】

条件	反応時間	分解率	T G	D G	M G	F G	油水分離
無溶媒	840時間	80~82%	10%	8%	-	82%	悪い
ヘキサン	296	70~75	17	12	1%	72	良好
イソオクタン	240	81	14	8	-	78	
無溶媒	96	74~75	20	16	-	64	

【0024】表2のTGは未反応トリグリセリド、DGはジグリセリド、MGはモノグリセリド、FAは脂肪酸

を表し、HPLCカラム (SHODEX GPCK f-802 昭和電工社製 300×3) で求めた。イソオクタンを添加すると無溶媒に比較すると 6~7% 分解率も上昇し油水分離も良好であった。また前記の固定化リバーゼによると油水分離に悪影響を及ぼす界面活性作用の強いモノグリセリドの生成も少なかった。

【0025】また以下の表3には鰯油及び無溶媒の分解産物 (分解率 81%) 中の脂肪酸組成を示す。グリセリド及び脂肪酸画分は、分解産物を薄層クロマトグラフィ\*

\*一により分画した。表2および表3をみると未分解のジグリセリド部分 (DG) には  $\omega-3$  のエイコサペンタエン酸 (C20:5)、ドコサペンタエン酸 (C22:5)、およびドコサヘキサエン酸 (C22:6) が濃縮されているが、これは低比重生成物中に回収される。なお表3中、下線を付した数値は  $\omega-3$  高度不飽和脂肪酸についてのものである。

【0026】

【表3】

脂肪酸	脂肪酸画分	グリセリド画分	鰯油
C14	3.0%	3.0%	3.0%
C16	19.9	15.3	17.4
C16:1	6.0	6.6	6.9
C18:0	5.3	4.8	4.6
C18:1	29.9	27.4	28.6
C18:2	7.7	6.6	7.3
C20:1	4.6	4.6	4.6
C20:5	4.5	9.3	6.5
C22:5	1.6	2.6	2.1
C22:6	7.7	10.6	9.1

#### 【0027】実施例3

実施例2の無溶媒の低比重生成物 (分解率 81%) にヘキサンを加え無水硫酸ナトリウムで脱水し、ヘキサンを蒸散させた分解産物 3.5 g に、低温分別結晶法による濃縮のため軽質溶剤として 7 倍量のアセトンを加え、-5 °C で一晩放置後濾過し、-50 °C にしたアセトンで洗浄し濾液及び洗液のアセトンを蒸散させ 1 次濃縮物 1.8, 7.2 g を得た。再び 7 倍量のアセトンを加え -80 °C で一晩放置後同様にして 2 次濃縮物 1.0, 3.1 g を得た。2 次濃縮物 1 g にグリセリン 0.0714 g をリボザイムIM60を 0.1 g 加え、10~20トル (Torr) まで脱気し真空乾燥しながら、60 °C で振とう反応した。リボザイムIM60 (Novo 社製) はムコール・ミーハイの生産したリバーゼをマクロ細孔の陰イオン交換樹脂に固定化したものである。48 時間後の反応物の組成は、トリグリセリド 61.2%, ジグリセリド

22.0%、モノグリセリド 2.8% より脂肪酸 13.9% であった。この反応物をエチルエーテルに溶かし固定化酵素を濾別した後、塩基性アルミナカラム (アルミニウムオキシド 90 (メルク社製製品番号 1076) およびアルカリ脱酸法により精製した。各段階の組成および脂肪酸組成を、表4に示す。表中、下線を付した数値はいずれも  $\omega-3$  高度不飽和脂肪酸についてのものであり、特にエイコサペンタエン酸およびドコサペンタエン酸の場合にはアセトンによる低温分別結晶法による濃縮の結果、第2次濃縮物にいざれも 2 倍濃縮されていることが判る。またこれらの脂肪酸はグリセリンとの反応によりドコサヘキサエン酸 (C22:6) の取込みが若干悪いがトリグリセリドに変換されることを示している。

【0028】

【表4】

項目	低比重生成物	2次濃縮物	トリグリセリド
<b>組成</b>			
TG	9.6%	8.8%	89.8%
DG	8.9	10.4	
MG		2.2	1.5
FA	81.6	78.6	8.6
<b>脂肪酸組成</b>			
C14	3.1%	1.2%	1.4%
C16	17.4	1.0	1.3
C16:1	7.0	8.9	10.8
C18:0	4.8	0.9	1.1
C18:1	28.8	16.3	19.6
C18:2	7.8	14.9	17.8
C20:1	4.7	3.4	2.9
C20:5	6.2	14.4	15.2
C22:5	2.0	4.5	4.7
C22:6	9.2	20.8	11.9

## 【0029】実施例4

実施例2のイソオクタン添加の低比重生成物（分解率81%）にイソオクタンを蒸散させた加水分解物190gに塩形成法による濃縮のために軽質溶剤として7倍量のアセトン1330gおよび4規定の水酸化カリウムメタノール溶液202mlを加え30分間室温で攪拌し-20℃に16時間放置した。次いでカリウム塩として沈殿する部分を除き濾液58.2gに対し、58.2gのアセトンを加えて、-20℃に16時間放置した。沈殿する部分を除き濾液を4規定の塩酸で酸性にしアセトンを蒸散させたのちヘキサンを加え洗液がpH7なるまで水洗した。ヘキサンを蒸散させて24.4gのω-3高度不飽和脂肪酸濃縮物を得た。この濃縮物1gにグリセリン

0.09gおよび固定化リバーゼsp382を0.1gを加え、60℃で24時間10~20トル(Torr)まで脱気し、真空乾燥しながら60℃で振とう反応した。固定化リバーゼsp382(Novo社製)はキャンデダ・アンタクチカの生産するリバーゼをアクリル樹脂に固定化したものである。24時間後のこの反応物の組成は、トリグリセリド68.3%、ジグリセリド24.7%、モノグリセリド3.7%および脂肪酸3.3%であった。この反応物をエチルエーテルに溶かし固定化酵素を濾別した後、塩基性アルミニカラムにより精製した。各段階の組成および脂肪酸組成を、表5に示す。

## 【0030】

【表5】

項目	低比重生産物	濃縮物	トリグリセリド
<b>組成</b>			
T G	10.0%	0.0%	99.1%
D G	7.2	0.0	0.0
M G	0.0	0.0	0.0
F A	82.8	100	0.7
<b>脂肪酸組成</b>			
C14	<u>3.5%</u>	1.7%	1.4%
C16	19.4	0.3	0.3
C16:1	7.1	2.6	0.6
C18:0	4.5	0.4	0.3
C18:1	30.6	2.9	2.7
C18:2	7.5	4.9	5.9
C20:1	3.3	5.2	4.2
C20:5	<u>5.8</u>	<u>27.6</u>	<u>24.9</u>
C22:5	<u>1.7</u>	<u>5.5</u>	<u>5.7</u>
C22:6	<u>7.9</u>	<u>38.0</u>	<u>31.1</u>

【0031】表中、下線を付した数値は $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸についてのものである。本方法によると、トリグリセリド合成の際の酵素としてキャンディダ属の菌由来のリバーゼを用いているので、ドコサヘキサエン酸(C<sub>22</sub>:6)のトリグリセリドへの取り込みが良くトリグリセリド合成量も68.3%と良いものであった。

### 【0032】

【発明の効果】 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸は、循環器系疾病の予防効果、ラットの学習能力の向上効果等重要な生理的意義がある。本発明によれば、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を豊富に含み多量に供給入手が可能な魚油等の油脂を原料として、酵素反応を利用して $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸含有油脂を一旦加水分解して脂肪酸とし、これを低温分別結晶法などの濃縮方法により他の脂肪酸などから分離濃縮し、再度酵素反応を利用してグリセリンと反応させることにより、 $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸トリグリセリド油脂を効率良く得ることができる。この際の原料油脂は安価であり、反応はすべて緩和な条件下で実施でき、しかも $\omega-3$ 高度不飽和脂肪酸を実質的な変成を起

すことなく高度に濃縮できる。従って本発明は単に機能性食品としての利用ばかりでなく医学的および薬学的な応用にたいしても寄与するものである。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】向流接觸型の二相系固定化酵素充填反応器の説明断面図である。

### 【符号の説明】

1. 低比重生産物排出管
2. 上端の静置層
3. 高比重基質供給管
4. 搅拌槽
5. 仕切り板
6. パルス発生機
7. 低比重基質供給管
8. 下端の静置層
9. 高比重生産物排出管
10. エマルジョン破壊装置
11. パルス発生機につながれた分歧管
12. 定量ポンプにつながれた分歧管

---

フロントページの続き

(72)発明者 富塚 登

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

(72)発明者 東 直輝

千葉県船橋市日の出2丁目17番1号 ポーソー油脂株式会社内